

ЗООЛОГИЯ / ZOOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.79>**РОЛЬ СТРУКТУРЫ ФРАГМЕНТОВ СУЛЬФОКИСЛОТЫ [АЛКИЛ(АРИЛ)СУЛЬФОНИЛ]-ТРИАЗОЛОВ В РАЗВИТИИ АДАПТАЦИЙ У *PARAMECIUM CAUDATUM EHRENBORG***

Научная статья

Белоусова З.П.¹, Селезнева Е.С.², Исаичкин В.А.^{3,*}^{1,3} Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, Российская Федерация² Самарский университет, Самара, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (vadim.isaichkin.99[at]mail.ru)

Аннотация

Исследовали токсичность 1,2,4-триазола и 1,2,4-триазолидов метан-бензол и *n*-толуолсульфокислот для *Paramecium caudatum* Ehrenberg, а также способность инфузорий приспосабливаться к их токсичности. Обнаружили, что синтезированные соединения достоверно отличаются по токсичности, с увеличением концентрации и времени их воздействия она возрастает. Было проведено предварительное культивирование инфузорий в течение 10 дней в водных растворах [алкил(арил)сульфонил]-триазолов в концентрации 0,0001 мг/мл. Затем инфузории переносили в растворы этих же веществ в концентрации 0,1 и 1 мг/мл и исследовали смертность. Оказалось, что на способность инфузорий адаптироваться влияет структура фрагмента сульфокислоты триазолидов. Лучше всего приспособление идёт к триазолидам, в состав которых входит метильная группа.

Ключевые слова: 1,2,4-триазолиды сульфокислот, *Paramecium caudatum*, адаптации, токсичность, биотрансформация, дозозависимый эффект.

ROLE OF THE [ALKYL(ARYL)SULFONYL]-TRIAZOLE SULFONIC ACID FRAGMENT STRUCTURE IN THE DEVELOPMENT OF ADAPTATIONS IN *PARAMECIUM CAUDATUM EHRENBORG*

Research article

Belousova Z.P.¹, Selezneva E.², Isaichkin V.A.^{3,*}^{1,3} Samara National Research University, Samara, Russian Federation² Samara University, Samara, Russian Federation

* Corresponding author (vadim.isaichkin.99[at]mail.ru)

Abstract

The toxicity of 1,2,4-triazole and 1,2,4-triazolid methane-benzene and *p*-toluenesulfonic acids to *Paramecium caudatum* Ehrenberg as well as the ability of infusoria to adapt to their toxicity were studied. The fact that the synthesized compounds differed significantly in toxicity, increasing with rise of concentration and time of exposure was established. Pre-cultivation of infusoria for 10 days in aqueous solutions of [alkyl(aryl)sulfonyl]-triazoles at a concentration of 0.0001 mg/ml was performed. Then, infusoria were transferred to solutions of the same substances at concentrations of 0.1 and 1 mg/ml, and their mortality was studied. It turned out that the structure of the triazolid sulfonic acid fragment influences the ability of infusoria to adapt. The best adaptation takes place with triazolid compounds that contain a methyl group.

Keywords: 1,2,4-triazolid sulfoxides, *Paramecium caudatum*, adaptations, toxicity, biotransformation, dose-dependent relationship.

Введение

Понимание механизмов, с помощью которых организмы адаптируются к быстрым изменениям окружающей среды вследствие антропогенного воздействия, стало одним из важных вопросов в биологии, потому что адаптации являются основой эволюции. В своей фундаментальной работе Хочачка и Сомеро рассмотрели биохимические механизмы, лежащие в основе адаптаций [1]. Они утверждают, что уровень обмена веществ, и в частности энергетического метаболизма, определяют адаптивные возможности организма. Усилия ученых последних десятилетий были направлены на поиск биохимических механизмов адаптаций [2, С.127]. Они предположили, что организмам проще мигрировать из зоны, содержащей ксенобиотиками, чем перестроить метаболизм клеток. По этой причине только у неподвижных форм можно одновременно наблюдать разные формы биохимических приспособлений после воздействия ксенобиотиками [3, С. 35].

Между тем существует ряд исследований, показавших, что строение и концентрация антропогенного ксенобиотика играет немаловажную роль в способности организмов адаптироваться [4, С.108], [5, С. 76-78], [6, С. 121].

Одной из перспективных групп организмов-индикаторов, позволяющих быстро выявить адаптивную реакцию организмов, являются протисты, в частности, инфузории. Их высокая чувствительность к токсическому действию различных поллютантов позволяет обнаружить загрязнения на самых ранних стадиях и при незначительных концентрациях [7, С.13].

Поэтому для выяснения роли структурных фрагментов производных 1,2,4-триазола в развитии биологического ответа мы использовали *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Для исследования выбраны производные алкил- и арилсульфокислот 1,2,4-триазола, а также исходный 1,2,4-триазол.

Материал и методы

Общая методика получения [алкил(арил)сульфонил]-триазолов (I-III).

В раствор 1,2,4-триазола в безводном растворителе (ТГФ) добавили эквимольное количество триэтиламина и при перемешивании внесли по каплям эквимольное количество раствора хлорангидрида соответствующей сульфокислоты в безводном растворителе. После перемешивания в течение 1 часа выпавший осадок гидрохлорида триэтиламмония отфильтровали, фильтрат упарили в вакууме. Получили масло, закристаллизовавшееся при охлаждении (0±5°C). Продукт реакции очищали перекристаллизацией из бензола. Получили белое мелкокристаллическое вещество.

1-(Метилсульфонил)-1*H*-1,2,4-триазол (I). Выход 61%, т.пл. 90–91°C, ИК спектр, ν , см⁻¹: 1366, 1138 (–SO₂N), 1324 (CH₃–S); Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт - ТМС), δ , м.д.: 3.43 с (3H CH₃), 8.13 с (1H, H5 Het), 8.69 с (1H, H3 Het).

4-(Фенилсульфонил)-4*H*-1,2,4-триазол (II). Выход 64%, т.пл. 102–103°C, ИК спектр, ν , см⁻¹: 1328, 1155 (–SO₂N); Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт - ТМС), δ , м.д.: 7.54 м (2H, H3, H5), 7.63 м (1H, H4), 7.73 м (2H, H2, H6), 8.31 с (2H, H2, H5 Het).

4-(Толлилсульфонил)-4*H*-1,2,4-триазол (III). выход 61%, т.пл. 98–99°C, ИК спектр, ν , см⁻¹: 1375, 1141 (–SO₂N); Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, ДМСО-*d*₆, внутренний стандарт - ТМС), δ , м.д.: 2.32 с (3H CH₃), 7.32 м (2H, H3, H5), 7.66 м (2H, H2, H6), 8.30 с (2H, H2, H5 Het).

Объектом исследования служили инфузории *Paramecium caudatum Ehrenberg* из моноклональной линии, выделенной из проб, взятых в Саратовском водохранилище. Инфузории содержались в органической среде на основе дрожжевого отвара [8, С.207-212] по методике полунепрерывного культивирования с ежедневной заменой части среды [9].

Инфузории содержали при температуре +24 °С. В качестве культиваторов использовали стеклянные плоскодонные колбы объемом 100 мл.

Исследовали токсичность водных растворов: 1,2,4-TriH, 1-(CH₃SO₂)-1*H*-1,2,4-Tri (I), 4-(PhSO₂)-4*H*-1,2,4-Tri (II), 4-(TolSO₂)-4*H*-1,2,4-Tri (III), в концентрациях: 0.001; 0.1; 1 мг/мл. Токсичность оценивали по количеству погибших инфузорий.

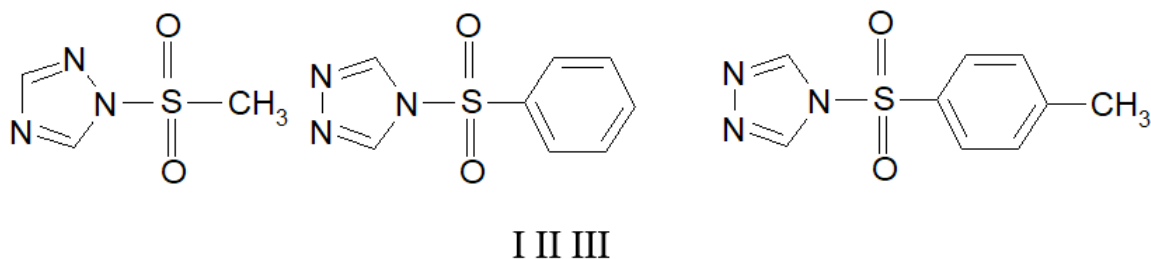


Рисунок 1 - Используемые растворы

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.79.1>

Было проведено 2 серии экспериментов.

Серия 1

С помощью микропипетки из культуры отбирали по 10 штук инфузорий и вносили в лунки планшета для исследования таким образом, чтобы для каждой концентрации синтезированного триазиолида анализировали не менее 36 лунок. Объем среды в лунке доводили до 100 мкл путем добавления чистого раствора исследуемого вещества рабочей концентрации. Затем через 1 и 3 часа проводили подсчет погибших клеток. Каждый эксперимент проводили в трех повторах.

Серия 2

В течение 10 дней культура *Paramecium caudatum Ehrenberg* адаптировалась исследуемыми соединениями. Ежедневно сливали 1/3 объема культуры и доливали такое же количество питательной среды с исследуемым веществом в концентрации 0,001 мг/мл. Затем преадаптированных особей по 10 штук помещали в лунки планшета для исследований, чтобы для каждого вещества было проанализировано не менее 36 лунок.

Достоверность различий между опытом и контролем, действием различных веществ в разных концентрациях оценивали с помощью полного двухфакторного дисперсионного анализа [10]. Различия между выборками считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждения

Проведенные исследования показали, что токсический эффект исследуемых соединений носит дозозависимый характер, и смертность инфузорий возрастает с увеличением концентрации соединений и времени воздействия.

Проведенный статистический анализ показал, что соединения достоверно различаются по токсичности ($p < 0,05$). С увеличением времени воздействия и концентрации веществ достоверно возрастает токсичность соединений, что выражается в повышении уровня смертности (таблица 1).

Таблица 1 - Гибель *Paramecium caudatum* Ehrenberg (%) при воздействиях 1,2,4-TriH и [алкил(арил)сульфонил]-триазолами (I-III)DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.79.2>

Исследуемые концентрации (мг/мл)	0,0001		0,001		0,01		0,1		1	
	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
TriH	0	0	4	6	72	77	84	86	95	95
I	0	0	3	5	25	36	64	72	100	100
II	0	0	2	3	18	22	49	52	100	100
III	0	0	3	4	15	20	42	49	100	100

В концентрации 1 мг/мл синтезированные триазолы вызывают 100% гибель инфузорий, в то время как 1,2,4-триазол вызывает смертность 95% особей. Обнаружили, что с увеличением молекулярной массы синтезированных триазолов в концентрации 0,1 мг/мл их токсичность падает. В концентрации 0,0001 мг/мл все исследованные соединения оказались нетоксичными для инфузорий.

Результаты второй серии экспериментов представлены в таблице 2. Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что предварительная преадаптация в течение 10 суток обнаруженной нетоксичной дозой достоверно ($p < 0,0001$) снижает смертность инфузорий при последующем помещении их в токсичные концентрации – 0,1 и 1 мг/мл. Можно утверждать, что механизмы, используемые *Paramecium caudatum* Ehrenberg для адаптации, различны для анализируемых веществ. Наиболее сильно снижается смертность под действием соединений I и III, в структуру сульфокислоты которых входит метильная группа. Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что предварительная преадаптация в течение 10 суток обнаруженной нетоксичной дозой достоверно ($p < 0,0001$) снижает смертность инфузорий при последующем помещении их в токсичные концентрации – 0,1 и 1 мг/мл. Можно утверждать, что механизмы, используемые *Paramecium caudatum* Ehrenberg для адаптации, различны для анализируемых веществ.

Таблица 2 - Смертность инфузорий (в %) после преадаптирования культур 1,2,4-TriH и [алкил(арил)сульфонил]-триазолами (I-III) самих к себе нетоксичной дозой в течение 10 суток и последующим воздействию двумя токсичными дозами

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.122.79.3>

Концентрации действующих веществ после преадаптации в течение 10 суток нетоксичной дозой	0,1 мг/мл		1 мг/мл	
	1	3	1	3
TriH	30	40	40	41
I	19	20	21	25
II	20	24	38	40
III	10	11	15	16

Наиболее сильно снижается смертность под действием соединений I и III, в структуру сульфокислоты которых входит метильная группа.

Большинство ксенобиотиков, попав в организм, не оказывают прямого биологического эффекта и, подвергаясь биотрансформации, выделяются в виде метаболитов. Так как в процессе биотрансформации принимают участие ферменты, можно предположить, что для некоторых из них наличие метильных групп в структуре ксенобиотиков является фактором, индуцирующим их активность. Это совпадает с результатами исследований, полученными нами ранее при анализе возможности развития адаптивного ответа у *Staphylococcus aureus* [11 С. 27-29].

Заключение

1,2,4-Триазол и его производные [алкил(арил)сульфонил]-триазолы токсичны для *Paramecium caudatum Ehrenberg* в концентрациях от 0,001 до 1 мг/мл. С увеличением времени воздействия и концентрации их токсичность для инфузорий возрастает.

Преадаптация культур инфузорий в течение 10 дней нетоксичной дозой 0,0001 мг/мл исследуемыми соединениями, приводит к развитию адаптивного ответа к высокотоксичным дозам, причём наиболее сильная адаптация развивается при преадаптации триазолидами, в структуру сульфокислоты которых входит метильная группа.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – Москва : Мир. – 1988. – 568 с.
2. Фокина Н.Н. Биохимические адаптации морских двустворчатых моллюсков к аноксии (обзор) / Н. Н. Фокина, З. А. Нефедова, Н. Н. Немова // Труды Карельского научного центра РАН. – 2011. – № 3. – С. 121-130.
3. Срослова Г.А. Особенности адаптации живых организмов / Г. А. Срослова, М. В. Постнова, Ю. А. Зимина // Природные системы и ресурсы. – 2017. – Т. 7. – № 4. – С. 32-38.
4. Селезнева Е.С. Анализ влияния бензотриазола на некоторые морфо-физиологические показатели *Allium fistulosum* / Е.С. Селезнева // Самарский научный вестник. – 2019. – Т. 8. – № 1 (26). – С. 105-109.
5. Ерофеева Е.А. Влияние автотранспортного загрязнения на скорость выхода из состояния зимнего покоя и окончание вегетации у липы мелколистной / Е.А. Ерофеева // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – № 2 (2). – С. 76-78.
6. Васин А.Е. Изучение токсичности некоторых производных бензимидазола. / А.Е. Васин, З.П. Белоусова, Ю.П. Зарубин и др. // Бултеровские сообщения. – 2015. – Т. 41. – № 3. – С. 119-123.
7. Васин А.Е. Адаптация инфузорий *Paramecium multimicronucleatum* к солям некоторых тяжелых металлов / А. Е. Васин // Вестник СамГУ. – Естественнонаучная серия. – 2006. – № 7(47). – С.12-18.
8. Сазонова В.Е. Использование биотестов при разработке мониторинга водной экосистемы / В.Е. Сазонова, Л.А. Зализняк, Л.М. Савельева // Экология. – 1997. – № 3. – С. 207-212.
9. Кокова В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / В.Е. Кокова. – Новосибирск : Наука. – 1982. – 168 с.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – Москва : Практика. – 1998. – 459 с.
11. Селезнева Е.С. Анализ способности *Staphylococcus aureus* адаптироваться к воздействию синтетическими триазолидами / Е.С. Селезнева, З.П. Белоусова, А.И. Иванчина и др. // Хим.-фарм. журнал. – 2006. – Т. 40 – № 3. – С. 27-29.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Hochachka P. Biohimicheskaja adaptacija [Biochemical adaptation] / P. Hochachka, Dzh. Somero. – Moscow : Mir. – 1988. – 568 p. [in Russian]
2. Fokina N.N. Biohimicheskie adaptacii morskih dvustvorchatyh molljuskov k anoksii (obzor) [Biochemical adaptations of marine bivalves to anoxia (review)] / N.N. Fokina, Z.A. Nefedova, N.N. Nemova // Trudy Karel'skogo nauchnogo centra RAN [Proceedings of the Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. – 2011. – № 3. – P. 121-130. [in Russian]
3. Sroslova G.A. Osobennosti adaptacii zhivyh organizmov [Features of adaptation of living organisms] / G.A. Sroslova, M.V. Postnova, Ju.A. Zimina // Prirodnye sistemy i resursy [Natural systems and resources]. – 2017 – Vol. 7 – № 4. – P. 32-38. [in Russian]
4. Selezneva E.S. Analiz vlijaniya benzotriazola na nekotorye morfo-fiziologicheskie pokazateli *Allium fistulosum* [Analysis of the effect of benzotriazole on some morphophysiological parameters of *Allium fistulosum*] / E.S. Selezneva // Samariskij nauchnyj vestnik [Samara Scientific Bulletin]. – 2019. – Vol. 8. – № 1 (26). – P. 105-109. [in Russian]
5. Erofeeva E.A. Vlijanie avtotransportnogo zagryznenija na skorost' vyhoda iz sostojanija zimnego pokoja i okonchanie vegetacii u lipy melkolistnoj [The influence of road pollution on the rate of exit from the state of winter rest and the end of vegetation in small-leaved linden] / E.A. Erofeeva // Vestnik NNGU im. N. I. Lobachevskogo [Bulletin of the N.I. Lobachevsky National Research University]. – 2011. – № 2 (2). – P. 76-78. [in Russian]
6. Vasin A.E. Izuchenie toksichnosti nekotoryh proizvodnyh benzimidazola [Study of the toxicity of some benzimidazole derivatives] / A.E. Vasin, Z.P. Belousova, Ju.P. Zarubin, et al. // Butlerovskie soobshhenija [Butlerov messages]. – 2015. – Vol. 41. – № 3. – P. 119-123. [in Russian]
7. Vasin A. E. Adaptacija infuzorij *Paramecium multimicronucleatum* k soljam nekotoryh tjazhelyh metallov [Adaptation of *Paramecium multimicronucleatum* infusoria to salts of some heavy metals] / A.E. Vasin // Vestnik SamGU – Estestvennonauchnaja serija [Bulletin of the Samara State University. – Natural Science series]. – 2006. – №7 (47). – P. 12-18. [in Russian]

8. Sazonova V.E. Ispol'zovanie biotestov pri razrabotke monitoringa vodnoj jekosistemy [The use of biotests in the development of monitoring of the aquatic ecosystem] / V.E. Sazonova, L.A. Zaliznjak, L.M. Savel'eva // Jekologija [Ecology]. – 1997. – № 3. – P. 207-212. [in Russian]
9. Kokova V.E. Nepreryvnoe kul'tivirovanie bespozvonochnyh [Continuous cultivation of invertebrates] / V.E. Kokova. – Novosibirsk : Nauka. – 1982. – 168 p. [in Russian]
10. Glanc S. Mediko-biologicheskaja statistika [Biomedical statistics] / S. Glanc. – Moscow : Praktika. – 1998. – 459 p. [in Russian]
11. Selezneva E.S. Analiz sposobnosti Staphylococcus aureus adaptirovat'sja k vozdeystviyu sinteticheskimi triazolidami [Analysis of the ability of Staphylococcus aureus to adapt to the effects of synthetic triazolides] / E.S. Selezneva, Z.P. Belousova, A.I. Ivanchina, et al. // Him.-farm. Zhurnal [Chem.-pharm. journal.]. – 2006. – Vol. 40. – № 3. – P. 27-29. [in Russian]